

For more records, click the Records link at page end.

To change the format of selected records, select format and click Display Selected.

To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.

To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

☒ Select All
☒ Clear Selections

Print/Save Selected

Send Results

Format
Display Selected Free

1. ☐

1/5/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013312552

WPI Acc No: 2000-484489/200043

XRAM Acc No: C00-145898

Immobilizing lipases for use in hydrolysis or esterification
by absorbing the lipase on a porous, anion exchanging resin carrier

Patent Assignee: KAO CORP (KAOS); KASE M (KASE-I); KOMATSU T (KOMA-I);
SHIMIZU M (SHIM-I)

Inventor: KASE M; KOMATSU T; SHIMIZU M

Number of Countries: 027 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 1008647	A2	20000614	EP 99123990	A	19991207	200043 B
JP 2000166552	A	20000620	JP 98350920	A	19981210	200043
JP 2000166589	A	20000620	JP 98346822	A	19981207	200043
US 20030096383	A1	20030522	US 99453078	A	19991202	200336

Priority Applications (No Type Date): JP 98350920 A 19981210; JP 98346822 A 19981207

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 1008647	A2	E 10	C12N-011/08	

Designated States (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT
LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI

JP 2000166552 A 3 C12N-011/08

JP 2000166589 A 4 C12P-007/64

US 20030096383 A1 C12P-007/64

Abstract (Basic): EP 1008647 A2

NOVELTY - A process (A) for preparing an immobilized enzyme is new and comprises immobilizing a lipolytic enzyme on a porous, anion-exchanging resin carrier by absorption and, without drying.

DETAILED DESCRIPTION - A process (A) for preparing an immobilized enzyme is new and comprises immobilizing a lipolytic enzyme on a porous, anion-exchanging resin carrier by absorption and, without drying, and treating the immobilized enzyme with fats or oils or their derivatives.

USE - The immobilized enzyme in process (A) may be used for hydrolysis or esterification of fats or oils or their derivatives (claimed). The fat or oil may be a triglyceride and its derivative may be an aliphatic acid, glycerol or a partial glyceride such as a mono- or diglyceride.

ADVANTAGE - Using the new method for immobilization maximal activity of the enzyme is maintained, in contrast to prior art methods of immobilization which involved drying of the enzyme onto the carrier. The drying decreased the activity of the enzyme.

pp: 10 DwgNo 0/0

Title Terms: IMMOBILISE; HYDROLYSIS; ESTERIFICATION; ABSORB; LIPASE; POROUS
; ANION; EXCHANGE; RESIN; CARRY

Derwent Class: A97; D16; D23; E17

International Patent Class (Main): C12N-011/08; C12P-007/64

International Patent Class (Additional): C11C-001/06

File Segment: CPI

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

✓ Select All	Print/Save Selected	Send Results	Display Selected	Format
✗ Clear Selections				Free

© 2003 The Dialog Corporation

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-166589
(P2000-166589A)

(43) 公開日 平成12年6月20日 (2000.6.20)

(51) Int.Cl.⁷
C 1 2 P 7/64

識別記号

F I
C 1 2 P 7/64

テ-マコ-ト* (参考)
4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平10-346822

(22) 出願日 平成10年12月7日 (1998.12.7)

(71) 出願人 000000918
花王株式会社
東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
(72) 発明者 清水 雅美
茨城県鹿島郡神栖町東深芝20 花王株式会
社研究所内
(72) 発明者 加瀬 実
茨城県鹿島郡神栖町東深芝20 花王株式会
社研究所内
(74) 代理人 100063897
弁理士 古谷 馨 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エステル化反応方法

(57) 【要約】

【課題】 活性発現を十分に発し、さらに酵素の脱離や失活を抑えたエステル化用固定化酵素を調製し、もってエステル化反応を促進する。

【解決手段】 油脂分解酵素を固定化用担体に吸着固定化した後、乾燥せずに直接反応基質と接触させてエステル化反応を行う。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 油脂分解酵素を固定化用担体に吸着固定化した後、乾燥せずに直接反応基質と接触させてエステル化反応を行うエステル化反応方法。

【請求項2】 固定化用担体として多孔性の陰イオン交換樹脂を用いる請求項1記載の方法。

【請求項3】 固定化の前処理として、担体を脂溶性脂肪酸若しくは脂溶性脂肪酸誘導体で処理する請求項1又は2記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、酵素を用いた脂肪酸とアルコールとのエステル化反応に関する。

【0002】

【従来の技術】油脂のエステル交換、及び脂肪酸とアルコールのエステル化を主目的とする反応用の酵素として、リパーゼと呼ばれている油脂分解酵素を担体に固定化した固定化酵素が用いられている。これらの反応は、加水分解を抑制するため、できるだけ低水分濃度（1000 ppm 以下）で行うことが有利であるため、固定化酵素の調製時から担体に数%の水分しか与えないように強制的に乾燥を行っている。しかし、固定化酵素の乾燥工程では吸着した酵素の失活が起こり易く、実際の活性発現時に吸着時の最大活性を発現しない場合が多い。特開昭60-134090号公報には、固定化後に脂肪酸誘導体の接触下で固定化酵素を乾燥させて活性発現を高めることが記載されているが、この方法では固定化酵素の乾燥に高価な設備が必要である上に、緩慢乾燥の条件設定等が複雑であり、実用的・効率的でない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】以上の状況において、活性発現を十分に発し、さらに酵素の脱離や失活を抑えたエステル化用固定化酵素を調製し、エステル化反応を促進することが望まれている。

【0004】

【課題を解決するための手段】この課題を解決するため本発明者が検討した結果、担体上に吸着した酵素に対し安定な状態を与える必要があり、このためには、反応基質と酵素とを、酵素の固定化後に速やかに接触させることが有効であることを見出した。即ち本発明は、油脂分解酵素を固定化用担体に吸着固定化した後、乾燥せずに直接反応基質と接触させてエステル化反応を行うエステル化反応方法である。

【0005】

【発明の実施の形態】エステル化反応の場合、脱水下で反応をシフトさせながら反応を行うため、反応を行いながら同時に脱水系を利用して固定化酵素に残存する過剰な水分を除くことが可能である。油脂分解酵素を固定化用担体に吸着固定化した後、乾燥せずに直接反応基質と接触させて行う初発のエステル化反応では、この過剰な

水分を除去するための余分な反応時間がかかってしまうが、従来行われている固定化酵素の乾燥時間に比べれば非常に短時間で済む。更に、この初発の反応で生じる生成物の組成や品質に関しては、2回目以降の反応で生じる生成物と遜色はない。この初発のエステル化反応において、酵素に対して必要な活性発現水分になるまでの時間は、使用する固定化酵素の量、脱水系の能力にもよるが、概ね1時間程度である。2回目以降の反応に関しては、初発の反応で過剰な水分が除去されているため、初発の反応で要した水分除去の時間は不要である。

10 【0006】本発明で使用する担体としては多孔性の陰イオン交換樹脂が良い。樹脂の粒子径は400～1000 μ mのものが望ましく、細孔径は100～1500Åのものが望ましい。樹脂の材質としては、フェノールホルムアルデヒド系、ポリスチレン系、アクリルアミド系、ジビニルベンゼン系等が挙げられる。特にフェノールホルムアルデヒド系樹脂が望ましい。この細孔が酵素吸着に大きな表面積を与え、より大きな吸着量を得ることができる。

20 【0007】本発明では、高活性を発現するような吸着状態にするため、固定化の前処理として、担体を脂溶性脂肪酸若しくは脂溶性脂肪酸誘導体で処理することが好ましい。使用する脂溶性脂肪酸若しくは脂溶性脂肪酸誘導体としては炭素数8～18のものが望ましい。例えば該脂肪酸としては、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸等の直鎖飽和脂肪酸、オレイン酸、リノール酸等の不飽和脂肪酸、リシノール酸等のヒドロキシ脂肪酸、もしくはイソステアリン酸等の分岐脂肪酸が挙げられる。脂肪酸誘導体としては、炭素数8～18の脂肪酸と水酸基を有する化合物とのエステルが挙げられ、1価アルコールエステル、多価アルコールエステル、リン脂質、あるいはこれらのエステルに更にエチレンオキサイドを負荷した誘導体等が例示される。1価アルコールエステルとしては、メチルエステル、エチルエステル等が、多価アルコールエステルとしては、モノグリセライド、ジグリセライド、及びそれらの誘導体、あるいはポリグリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、蔗糖脂肪酸エステル等が挙げられる。これらの脂肪酸及びその誘導体はいずれも常温で液状であることが工程上望ましい。またこれらは単一で用いても良いが、組み合わせることで一層の効果が発揮される。これらの誘導体は水性媒体中で化学的、もしくは油脂分解酵素で加水分解され、脂肪酸を生成するためと考えられる。これらの脂溶性脂肪酸及びその誘導体と多孔性陰イオン交換樹脂の接触法としては、水もしくは有機溶剤中にこれらをそのまま加えても良いが、分散性を良くするために溶剤に脂溶性脂肪酸又はその誘導体を一旦分散・溶解させた後、水に分散させた多孔性陰イオン交換樹脂に加えても良い。この時の有機溶剤としてはクロロホルム、ヘキサン、エタノール等が挙げられる。脂溶性脂肪酸及びその誘導体と多孔性陰イオン交換樹脂の比率は、多孔性陰イオン樹

30
40
50

脂 1 重量部 (乾燥重量) に対し、脂溶性脂肪酸及びその誘導体 0.01~1 重量部、特に 0.05~0.5 重量部が好ましい。接触温度は 0~100℃、好ましくは 20~60℃ が良い。接触時間は、5 分~5 時間程度で良い。

【0008】本発明で使用する油脂分解酵素は、モノグリセリドやジグリセリド等の部分グリセリドを調製する場合は、位置特異性を有するリゾプス (*Rizopus*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、クロモバクテリウム (*Chromobacterium*) 属、ムコール (*Mucor*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ジオトリケム (*Geotrichum*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属等の微生物起源のリパーゼ及び膵臓リパーゼ等の動物リパーゼが挙げられる。また高エステル化率でトリグリセリドを得るためには位置特異性のない (ランダム型) のリパーゼが良く、微生物起源ではシュードモナス (*Pseudomonas*) 属、及びキャンディダ (*Candida*) 属等が良い。

【0009】固定化を行う温度は酵素の失活が起きない 0~60℃、好ましくは 5~40℃ が良いが、酵素の特性によって選ぶことができる。また酵素溶液の pH は、酵素の変性が起きない範囲であれば良く、pH 3~9 が望ましい。これも温度同様酵素の特性によって決めれば良い。これらの pH を維持する緩衝液としては、特に限定しないが、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液等がある。

【0010】固定化の際の酵素溶液中の酵素濃度は、固定化効率の点から酵素の溶解度以下で且つ十分な濃度である事が望ましい。また必要に応じて不溶部を遠心分離で除去し、上澄を使用することも出来る。また固定化担体と酵素の比率は固定化担体 1 重量部に対して、酵素 0.05~10 重量部、特に 0.1~5 重量部で好ましい。

【0011】酵素と上記の如く処理した担体の接触は、酵素液中に担体を分散させて攪拌する方法や、カラム等の充填塔に担体を封入してポンプ等で酵素液を循環させる方法があるが、これらの何れでもよい。吸着固定化された固定化酵素は、物理的方法で充分水を切った状態で反応基質と接触させ、エステル化反応を行う。このとき固定化酵素中の水分は用いる担体の種類によっても異なるが、通常 20 重量%以上、好ましくは 40~60 重量%の範囲にある。

【0012】反応基質としては、炭素数 2~22 の脂肪酸が挙げられる。これらは飽和、不飽和の何れでもよく、また直鎖の他、分岐、共役二重結合等を含んでも良い。また、構造異性体を含んでも良く、特に限定されるものではない。単一脂肪酸組成を有するエステルや部分グリセリド、トリグリセリドを調製する場合は、これらの脂肪酸を単独で用いることができ、また、2 種類以上混合して用いてもよい。更に、脂肪酸としては、1 種以上の植物油・動物脂を完全分解または部分分解したものも使用できる。一方、アルコールとしては、炭素数

1~22 の 1 価のアルコール及び 2 価以上のアルコールが挙げられる。反応基質に関しては、目的とするエステル化物の調製が可能になるように上記の脂肪酸とアルコールを組み合わせ使用すればよく、特定のものの使用に限定されない。

【0013】エステル化の反応方法は、減圧脱水法、グリセリン脱水法、モレキュラーシーブ等の脱水剤を用いた脱水反応法等の公知の方法でよい。また、固定化酵素は、攪拌式反応器、充填塔反応器、流動床反応器の何れに使用してもよい。

【0014】

【発明の効果】本発明によれば、固定化酵素上の酵素に対して安定な状態を与え、極力乾燥による酵素の失活を抑えることで、吸着した酵素が持つ最大限の活性が引き出され、長期間に渡り、効率的で安定なエステル化反応を行うことができる。

【0015】

【実施例】実施例 1

Duolite A-568 (ダイヤモンドシャムロック社製) 10 g を N/10 の NaOH 溶液 100cc 中で 1 時間攪拌した。濾過した後 100cc のイオン交換水で洗浄し 500mM の酢酸緩衝液 (pH 7) 100cc で pH の平衡化を行った。その後 50mM の酢酸緩衝液 (pH 7) 100cc で 2 時間ずつ 2 回 pH の平衡化を行った。この後、濾過を行い担体を回収した後、エタノール 50cc でエタノール置換を 30 分行った。濾過した後、リシノール酸を 10 g 含むエタノール 50cc を加え 30 分間、リシノール酸を担体に吸着させた。その後、濾過し、担体を回収し、50mM の酢酸緩衝液 (pH 5) 50cc で 30 分ずつ 4 回洗浄し、エタノールを除去し、濾過して担体を回収した。その後、市販のリパーゼ (リ・リパーゼ 長瀬産業 (株) 製) 10 g を 50mM の酢酸緩衝液 (pH 7) 90cc に溶解した酵素液と 5 時間接触させ、固定化を行った。濾過し、固定化酵素を回収して、50mM の酢酸緩衝液 (pH 7) 100cc で洗浄を行い、固定化していない酵素や蛋白を洗浄した。以上の操作はいずれも 20℃で行った。固定化後の酵素液の残存活性と固定化前の酵素液の活性の差より固定化率を求めたところ、98%であった。次いで、大豆油を分解して生成した脂肪酸を 100 g 加え、良く攪拌した後、グリセリンを 16 g 添加し、40℃、減圧下 (13Pa 以下) でエステル化反応を行った。反応時間 4 時間で反応油中の DG (ジグリセリド) 収率 (ジグリセリド含有率+トリグリセリド含有率) は 63% に達した。この反応の後、反応終了油を濾別して固定化酵素を全量回収し、上記の大豆油分解脂肪酸 100 g とグリセリン 16 g を添加し、同反応を更に 2 回繰り返した。その結果、この 2 回の繰り返し反応とも、反応時間 2 時間で反応終了油中の DG 収率は 62% となった。以上の繰り返し反応において、DG 収率約 62% 反応時の反応油中の各成分組成を表 1 に示した。

【0016】比較例 1

実施例 1 で調製した固定化酵素を、実施例 1 に示した大豆油分解脂肪酸の添加なしに 40℃ で一昼夜減圧乾燥 (13 Pa 以下) した。乾燥後の水分量は約 2 % であった。この固定化酵素 10 g を用いて、実施例 1 と同様にエステル化反応を行い、3 回繰り返し反応を行った。その結果、

何れの反応でも反応 3 時間で DG 収率は 62 ~ 63 % であった。以上の繰り返し反応において、DG 収率約 62 % 反応時の反応油中の各成分組成を表 1 に示した。

【0017】

【表 1】

		反応時間 (hr)	各成分比 (重量%)					収率 (%)	純度 (%)
			FA	GLY	MG	DG	TG	DG+TG	DG/ (DG+TG)
実 施 例	1 回目	4.0	20.5	0.5	16.0	60.0	3.0	63.0	95.2
	2 回目	2.0	17.6	0.8	19.8	59.0	2.8	61.8	95.4
	3 回目	2.0	17.6	0.8	20.0	59.0	2.6	61.6	95.7
比 較 例	1 回目	3.0	18.9	0.7	18.5	59.6	2.3	61.9	95.3
	2 回目	3.0	17.2	0.7	19.1	60.2	2.8	63.0	95.6
	3 回目	3.0	17.2	0.8	19.0	58.6	4.6	63.0	92.9

FA ; 脂肪酸

GLY ; グリセリン

MG ; モノグリセライド

DG ; ジグリセライド

TG ; トリグリセライド

【0018】尚、上記例で反応終了油中の成分比は、サンプルをトリメチルシリル化してガスクロマトグラフィーで分析した結果である。上記の実施例 1 と比較例 1 との対比より、本発明方法により固定化酵素の乾燥を行わずに反応を行った場合は、反応時間の短縮ができ、生成

物の品質は損なわれないことが判明した。それぞれの酵素のエステル化の活性を比較したところ、反応基質で処理したものは 150 % (対乾燥品) の活性を発現したことになる。

フロントページの続き

(72)発明者 小松 利照
茨城県鹿島郡神栖町東深芝 20 花王株式会
社研究所内

(72)発明者 清水 将夫
茨城県鹿島郡神栖町東深芝 20 花王株式会
社研究所内

F ターム (参考) 4B064 AD61 CA21 CB24